



⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 196 33 185 A 1**

⑤ Int. Cl.⁸:
G 02 B 21/00
G 02 B 21/06

⑳ Aktenzeichen: 196 33 185.4
㉑ Anmeldetag: 17. 8. 96
㉒ Offenlegungstag: 23. 10. 97

DE 196 33 185 A 1

⑧ Innere Priorität:

196 14 929.0 16.04.96

㉑ Anmelder:

Leica Lasertechnik GmbH, 69120 Heidelberg, DE

㉒ Vertreter:

Ullrich & Naumann, 69115 Heidelberg

㉓ Erfinder:

Engelhardt, Johann, Dipl.-Phys. Dr., 76669 Bad
Schönborn, DE; Ulrich, Heinrich, Dipl.-Phys. Dr.,
69121 Heidelberg, DE

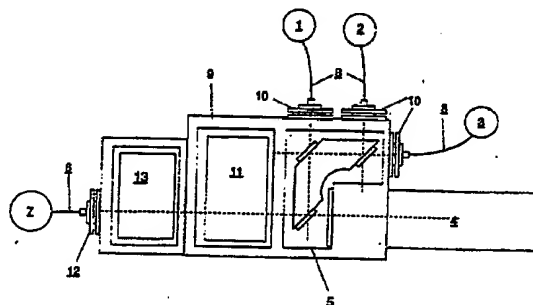
⑤⑥ Entgegenhaltungen:

DE 44 46 185 A1
DE 43 24 681 A1
EP 06 66 487 A2

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Punktlichtquelle für ein Laserscanmikroskop und Verfahren zum Einkoppeln von mindestens zwei Lasern unterschiedlicher Wellenlänge in ein Laserscanmikroskop

⑤⑦ Eine Punktlichtquelle für ein Laserscanmikroskop (7), wobei mindestens zwei Laser (1 und/oder 2 und/oder 3; 4) mit unterschiedlichen Wellenlängen in das Mikroskop (7) einkoppelbar sind, ist zur Kombination der Vorteile eines Multilinelasers mit den Vorteilen der Nutzung von mehreren unabhängigen Einlinienlasern gekennzeichnet durch mindestens zwei Laserlichtquellen, die in einen Strahlvereiniger (5) einkoppeln, und eine mittelbar oder unmittelbar vom Strahlvereiniger (5) zum Mikroskop (7) führende Lichtleitfaser (6).



DE 196 33 185 A 1

Die Erfindung betrifft eine Punktlichtquelle für ein Laserscannmikroskop, wobei mindestens zwei Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen in das Mikroskop einkoppelbar sind. Des weiteren betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Einkoppeln von mindestens zwei Lasern unterschiedlicher Wellenlänge in ein Laserscannmikroskop.

Lichtquellen der hier in Rede stehenden Art werden bei Laserscannmikroskopen, insbesondere bei der Konfokalmikroskopie, benötigt. Dabei geht es vor allem darum, im Rahmen einer Mehrfarbanwendung Laserlicht unterschiedlicher Wellenlänge in das Mikroskop einzukoppeln. Dies hat unter ganz besonderer Berücksichtigung der Justierbarkeit des Lasers und unter Berücksichtigung der Stabilität der Justage zu erfolgen.

Aus der Praxis sind zwei unterschiedliche Ansätze zur Mehrfarbanwendung bei Laserscannmikroskopen bekannt. Im Rahmen einer ersten Alternative wird ein Laser (ArKr) mit mehreren simultanen Wellenlängen verwendet. Dabei ist systemimmanent, daß dort alle Laserlinien — per se — aufeinander justiert sind. Die Selektion der Wellenlängen sowie die Leistungseinstellung wird dabei durch einen AOTF (Acousto Optical Tunable Filter) erreicht. Folglich läßt sich jede Laserlinie unabhängig von den anderen kontinuierlich in ihrer Leistung auch bis zu sehr niedrigen Leistungen einstellen. Die Einkopplung erfolgt jeweils durch eine Single-Mode-Faser. Der Vorteil der voranstehenden Einkopplungsmöglichkeit liegt in einem kompakten Scanner, in einer absoluten Justierstabilität sowie in einer Entkopplung der durch die Laserkühlung verursachten Vibration.

Die voranstehend geschilderten Vorteile bringen jedoch auch ganz erhebliche Nachteile mit sich. Ein ArKr-Laser umfaßt — wie bereits zuvor erwähnt — mehrere Laserlinien simultan. Da diese in einem Resonator erzeugt werden, bewirkt dies stets eine Instabilität der Einzellinien, zumal im Laser nur die Gesamtleistung durch eine Regelung konstant gehalten wird. Das hier auftretende Rauschen kann je nach Einstellung der Gesamtleistung bis zu 10 Prozent "Peak to Peak" betragen und verringert somit die Bildqualität bezüglich des Signal/Rauschverhältnisses. Im Gegensatz dazu erreichen Einlinienlaser gerade einmal 1 Prozent Rauschen.

Des weiteren ist das System bei Ausfall des — singulären — Lasers komplett funktionsuntüchtig. Die verfügbaren Laserlinien hängen stets vom laseraktiven Gas und dessen Mischung ab. Da sich diese über die Lebensdauer des Lasers verändert, findet eine Beeinträchtigung sämtlicher Laserlinien im Zeitverlauf statt. Schließlich sind nur die Laserlinien der verwendeten Gasmischung verfügbar, so daß hier stets eine Auswahl einschränkung vorliegt.

Bei einem weiter aus der Praxis bekannten System werden stets mehrere Laser direkt in ein Laserscannmikroskop eingekoppelt. Im Falle eines Laserdefekts fällt lediglich eine Laserlinie aus. Die anderen Laserlinien bleiben entsprechend der Funktion dieser Laser verfügbar. Die Laserleistung weist aufgrund des Single-Line-Betriebs eine hohe Stabilität auf. Single-Line-Laser verfügen über eine höhere Lebensdauer im Gegensatz zu Lasern mit mehreren Wellenlängen. Die Laserleistung läßt sich für jede Laserlinie ohne weitere Hilfsmaßnahmen optimal auf die experimentellen Bedingungen abstimmen.

Auch die voranstehend genannte Einkopplung mehrerer Laser in ein Laserscannmikroskop weist erhebliche

Nachteile auf, da nämlich die Laserstrahlen aus den unterschiedlichen Lasern auf ein und denselben Punkt in genau der gleichen Richtung fokussiert bzw. justiert werden müssen. Dabei existieren vier Freiheitsgrade pro Laser. Erfolgt die Fokussierung bzw. Justierung nicht in hinreichendem Maße, so sind die mit den unterschiedlichen Laserlinien aufgenommenen Bilder nicht deckungsgleich. Die Analyse deckungsgleicher Bilder ist aber gerade der Zweck einer Mehrfachanregung der hier in Rede stehenden Art.

Ein weiterer Nachteil der Verwendung mehrerer unterschiedlicher Laser ist darin zu sehen, daß herkömmliche Strahlvereinigungsanordnungen und Justagen häufig nachjustiert werden müssen. Dieser Vorgang ist äußerst kompliziert, da in den herkömmlichen Anordnungen die verschiedenen Freiheitsgrade der Justierungen nicht ausreichend voneinander entkoppelt sind.

So führt eine Winkeländerung stets auch zu einer Positionsänderung. Folglich wird das Justierziel erst nach vielen Justierzyklen erreicht, so daß die Justage wohl kaum vom Benutzer selbst durchgeführt werden kann. Eine besondere Serviceleistung des Geräteherstellers ist somit zwingend erforderlich. Schließlich sind mehrere Laser gemeinsam stets teurer als ein einzelner Laser mit mehreren Wellenlängen.

Der Erfindung liegt nun die Aufgabe zugrunde, eine Punktlichtquelle für ein Laserscannmikroskop anzugeben, die die Vorteile der beiden zuvor genannten Systeme — Multilinelaser und mehrere Einlinienlaser — nutzt und deren Nachteile zumindest weitestgehend ausschließt. Des weiteren soll ein Verfahren zur Nutzung einer solchen Punktlichtquelle angegeben werden.

Die erfindungsgemäße Punktlichtquelle löst die voranstehende Aufgabe durch die Merkmale des Patentanspruches 1. Danach ist eine Punktlichtquelle für ein Laserscannmikroskop gekennzeichnet durch mindestens zwei Laserlichtquellen, die in einen Strahlvereiniger einkoppeln, und durch eine mittelbar oder unmittelbar vom Strahlvereiniger zum Mikroskop führende Lichtleitfaser.

Erfindungsgemäß ist hier erkannt worden, daß die Verwendung von mindestens zwei unabhängigen Laserlichtquellen und somit von mindestens zwei unterschiedlichen Lasern die zuvor erörterten Vorteile mit sich bringt. Die damit verbundenen Nachteile lassen sich — ebenfalls erfindungsgemäß — dadurch ausschalten, daß bereits vor der Einkopplung in das Laserscannmikroskop eine Strahlvereinigung stattfindet, so daß von dort aus aufeinander justierte Laserstrahlen bzw. Laserlinien mit mehreren Wellenlängen — im Sinne eines Multilinelasers — zur Verfügung stehen, wie dies bei einem Laser mit mehreren simultan auftretenden Wellenlängen der Fall ist.

Nach der Strahlvereinigung werden die vereinten Laserlinien simultan über eine Lichtleitfaser zum Mikroskop geführt und dort — wie bei einem Laser mit mehreren simultan auftretenden Wellenlängen — eingekoppelt. Folglich sind sämtliche Laserlinien ab der Strahlvereinigung in die Faser automatisch aufeinander justiert. Eine Justage bzw. Einstellung findet somit ausschließlich in dem Strahlvereiniger statt, der sich als kompaktes Bauteil realisieren läßt. Eine besondere Justage auf die Einkopplung des Laserscannmikroskops ist jedenfalls nicht erforderlich.

In besonders vorteilhafter Weise und zur Minimierung des konstruktiven bzw. apparativen Aufwandes, insbesondere auch zur optimalen Nutzung des verfügbaren Raumes, koppelt einer der Laser unmittelbar in

den Strahlvereiner ein. Mit anderen Worten ist dieser Laser unmittelbar dem Strahlvereiner zugeordnet. Mindestens ein weiterer Laser wird über eine Lichtleitfaser in den Strahlvereiner eingekoppelt, wobei es sich hier um eine Single-Mode-Faser handeln kann. Neben dem unmittelbar in den Strahlvereiner einkoppelnden Laser können im konkreten und in ganz besonders vorteilhafter Weise zwei oder drei weitere Laser jeweils über eine gesonderte Lichtleitfaser in den Strahlvereiner einkoppeln. Dabei lassen sich Laserlinien mit unterschiedlichen Wellenlängen einkoppeln, so daß sich eine Mehrfarbanwendung ergibt.

Bei dem Strahlvereiner kann es sich um ein herkömmliches, aus dem Stand der Technik bekanntes Bauteil bzw. um eine entsprechende Anordnung handeln. So könnte der Strahlvereiner als dichroitischer Strahlvereiner mit Teilerspiegeln unterschiedlicher Transmissions-/Reflexions-Charakteristiken ausgeführt sein. Jede beliebige Anordnung zur Strahlvereinigung ist jedenfalls verwendbar, wobei eine monolithische Anordnung aus Gründen der Stabilität, der Präzision, der einfacheren Fertigung, aber auch aus Gründen eines geringeren Platzbedarfs zu bevorzugen ist. Eine Austauschbarkeit des Strahlvereiners gegen geometrisch analoge, physikalisch jedoch anders "getrimmte" Einrichtungen zur Strahlvereinigung ist realisierbar.

In ganz besonders vorteilhafter Weise ist der Strahlvereiner in einem Gehäuse angeordnet. Der unmittelbar in den Strahlvereiner einkoppelnde Laser ist gegebenenfalls über einen besonderen Adapterkopf am Gehäuse festgelegt bzw. koppelt unmittelbar am Gehäuse über den Adapterkopf in den Strahlvereiner ein. Die weiteren Laser koppeln jeweils über eine Lichtleitfaser in das Gehäuse und somit in den darin angeordneten Strahlvereiner und dessen Strahlengang ein.

Das Gehäuse ist vorzugsweise aus Metall hergestellt. Eine Fertigung aus Kunststoff ist insbesondere dann von Vorteil, wenn sich das Gehäuse spritzgußtechnisch herstellen läßt.

Zur Auswahl und individuellen Einstellung der Linienleistung ist dem Strahlvereiner in weiter vorteilhafter Weise ein AOTF (Acousto Optical Tunable Filter) nachgeschaltet. Dieser AOTF ist zum Erhalt eines kompakten Moduls ebenfalls innerhalb des Gehäuses angeordnet. Mit Hilfe des AOTF lassen sich unter anderem auch etwaige Einkopplungsverluste kompensieren.

Dem Strahlvereiner kann des weiteren ein AOM (Acousto Optical Modulator) nachgeschaltet sein, der zur Strahlmodulation und schnellen Strahlabschaltung dient. Auch hier bietet sich die Anordnung innerhalb des Gehäuses an, zumal sich dadurch ein kompaktes Modul insgesamt realisieren läßt.

Schließlich ist es hinsichtlich der beanspruchten Punktlichtquelle von ganz besonderem Vorteil, wenn die vom Strahlvereiner zum Mikroskop führende Lichtleitfaser, d. h. der Faserkoppler, als Single-Mode-Faser ausgeführt ist. Dadurch wird erreicht, daß sich kleinere Dejustagen lediglich durch geringe Einkopplungsverluste in die Faser auswirken. Wie bereits zuvor erwähnt, lassen sich diese geringen Einkopplungsverluste und damit verbundene Veränderungen der Linienleistungsverhältnisse durch Verwendung eines AOTF kompensieren.

Das erfindungsgemäße Verfahren zum Einkoppeln von mindestens zwei Lasern unterschiedlicher Wellenlänge in ein Laserscanmikroskop löst die eingangs genannte Aufgabe durch die Merkmale des Patentanspruches 12. Danach ist ein solches Verfahren dadurch ge-

kennzeichnet, daß die Laser gemeinsam als singuläre Punktlichtquelle mit simultanen Wellenlängen bzw. Laserlinien gemeinsam als singuläre Punktlichtquelle in das Mikroskop eingekoppelt werden.

Dabei ist es von ganz besonderem Vorteil, wenn bereits vor der Einkopplung in das Mikroskop — in einem unabhängigen Bauteil — eine Strahlvereinigung stattfindet. Von dort aus wird dann über eine vorzugsweise als Single-Mode-Faser ausgeführte Lichtleitfaser in das Mikroskop eingekoppelt.

Im Rahmen des hier beanspruchten Verfahrens könnte einer der Laser unmittelbar und mindestens ein weiterer Laser über eine Lichtleitfaser in das gekapselte Bauteil — Strahlvereiner — eingekoppelt werden.

Vor der Einkopplung in das Mikroskop könnte eine Auswahl und individuelle Einstellung der Linienleistung mittels eines AOTF (Acousto Optical Tunable Filter) stattfinden.

Ebenso könnte vor der Einkopplung in das Mikroskop eine Strahlmodulation und ggf. schnelle Strahlabschaltung mittels eines AOM (Acousto Optical Modulator) möglich sein. Beide Optionen lassen sich zugunsten einer kompakten Ausgestaltung der Punktlichtquelle bzw. des Punktlichtmoduls innerhalb des Gehäuses vor-

sehen. Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, die Lehre der vorliegenden Erfindung in vorteilhafter Weise auszugestalten und weiterzubilden. Dazu ist einerseits auf die Patentansprüche 1 und 12 nachgeordneten Ansprüche, andererseits auf die nachfolgende Erläuterung eines Ausführungsbeispiels der Erfindung anhand der Zeichnung zu verweisen. In Verbindung mit der Erläuterung des bevorzugten Ausführungsbeispiels der Erfindung werden auch im allgemeinen bevorzugte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Lehre erläutert.

In der Zeichnung zeigt die einzige Figur eine schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Punktlichtquelle mit insgesamt vier Lasern.

Das in der einzigen Figur dargestellte Modul läßt sich insgesamt als Punktlichtquelle für ein Laserscanmikroskop bzw. für ein Konfokalmikroskop definieren, wobei hier insgesamt vier Laser 1, 2, 3, 4 vorgesehen sind. Die Laser 1, 2, 3, 4 weisen unterschiedliche Wellenlängen auf.

Erfindungsgemäß ist ein Strahlvereiner 5 vorgesehen, in den die Laser 1, 2, 3, 4 mit ihren Laserstrahlen einkoppeln. Die "optische Ankopplung" aller Laser 1, 2, 3, 4 an ein nachgeschaltetes AOTF (Acousto Optical Tunable Filter) 11 erfolgt ausschließlich über den unteren Teilerspiegel des Strahlvereiners 5. Vom Strahlvereiner 5 führt ein gemeinsamer Strahlengang durch den AOTF 11 und ein AOM (Acousto Optical Modulator) 13 über eine Lichtleitfaser 6 zu dem in der Figur lediglich angedeuteten Laserscanmikroskop 7.

Die einzige Figur zeigt besonders deutlich, daß einer der Laser, nämlich der mit dem Bezugszeichen 4 gekennzeichnete Laser, unmittelbar in den Strahlvereiner 5 einkoppelt. Die anderen Laser 1, 2 und 3 koppeln jeweils über eine Lichtleitfaser 8 in den Strahlvereiner 5 ein.

Der Strahlvereiner 5 ist in einem Gehäuse 9 angeordnet. Entsprechend ist der unmittelbar in den Strahlvereiner 5 einkoppelnde Laser 4 direkt mit dem Gehäuse 9 verbunden. Ein entsprechender Adapterkopf ist hier der Einfachheit halber nicht dargestellt.

Die weiteren Laser 1, 2 und 3 führen über die Lichtleitfasern 8 durch die Gehäusewandung hindurch bzw.

durch entsprechende Anschlüsse 10 in das Gehäuseinnere, wobei dort eine Einkopplung in den Strahlvereiniger 5 stattfindet.

Wie bereits zuvor erwähnt, ist gemäß einziger Figur dem Strahlvereiniger 5 innerhalb des Gehäuses 9 ein AOTF (Acousto Optical Tunable Filter) 11 nachgeschaltet, wobei dieser AOTF 11 zur Auswahl und individuellen Einstellung der Linienleistung dient. Dem AOTF 11 ist wiederum ein AOM (Acousto Optical Modulator) 13 nachgeschaltet, der zur Strahlmodulation und schnellen Strahlabschaltung dient. Von dort aus führt die als Single-Mode-Faser ausgeführte Lichtleitfaser 6 über einen entsprechenden Anschluß 12 zum Laserscanmikroskop 7, um dort den Laserstrahl mit mehreren Wellenlängen bzw. mehreren Laserlinien im Sinne einer Lichtpunktquelle einzukoppeln.

Hinsichtlich des erfindungsgemäßen Verfahrens wird zur Vermeidung von Wiederholungen auf den allgemeinen Teil der Beschreibung verwiesen.

Schließlich sei ganz besonders darauf hingewiesen, daß das voranstehend erörterte Ausführungsbeispiel lediglich der Erörterung der hier beanspruchten Lehre dient, diese jedoch nicht auf das Ausführungsbeispiel einschränkt.

Patentansprüche

1. Punktlichtquelle für ein Laserscanmikroskop (7), wobei mindestens zwei Laser (1 und/oder 2 und/oder 3; 4) mit unterschiedlichen Wellenlängen in das Mikroskop (7) einkoppelbar sind, gekennzeichnet durch mindestens zwei Laserlichtquellen, die in einen Strahlvereiniger (5) einkoppeln, und eine mittelbar oder unmittelbar vom Strahlvereiniger (5) zum Mikroskop (7) führende Lichtleitfaser (6).
2. Punktlichtquelle nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß einer der Laser (4) unmittelbar und mindestens ein weiterer Laser (1 und/oder 2 und/oder 3) über eine Lichtleitfaser (8) in den Strahlvereiniger (5) einkoppeln.
3. Punktlichtquelle nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß einer der Laser (4) unmittelbar und zwei weitere Laser (1 und/oder 2 und/oder 3) jeweils über eine Lichtleitfaser (8) in den Strahlvereiniger (5) einkoppeln.
4. Punktlichtquelle nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß einer der Laser (4) unmittelbar und drei weitere Laser (1, 2, 3) jeweils über eine Lichtleitfaser (8) in den Strahlvereiniger (5) einkoppeln.
5. Punktlichtquelle nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Strahlvereiniger (5) als dichroitischer Strahlvereiniger ausgeführt ist.
6. Punktlichtquelle nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Strahlvereiniger (5) in einem Gehäuse (9) angeordnet ist und daß der unmittelbar in den Strahlvereiniger (5) einkoppelnde Laser (4) ggf. über einen Adapterkopf am Gehäuse (9) festgelegt ist.
7. Punktlichtquelle nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Gehäuse (9) aus Metall hergestellt ist.
8. Punktlichtquelle nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Gehäuse (9) aus Kunststoff hergestellt ist.
9. Punktlichtquelle nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß dem Strahlvereiniger

(5) vorzugsweise innerhalb des Gehäuses (9) ein AOTF (Acousto Optical Tunable Filter) (11) zur Auswahl und individuellen Einstellung der Linienleistung nachgeschaltet ist.

10. Punktlichtquelle nach einem der Ansprüche 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß dem Strahlvereiniger (5) vorzugsweise innerhalb des Gehäuses (9) ein AOM (Acousto Optical Modulator) (13) zur Strahlmodulation und schnellen Strahlabschaltung nachgeschaltet ist.

11. Punktlichtquelle nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die vom Strahlvereiniger (5) zum Mikroskop (7) führende Lichtleitfaser (6) als Single-Mode-Faser ausgeführt ist.

12. Verfahren zum Einkoppeln von mindestens zwei Lasern (1 und/oder 2 und/oder 3; 4) unterschiedlicher Wellenlänge in ein Laserscanmikroskop (7), dadurch gekennzeichnet, daß die Laser (1 und/oder 2 und/oder 3; 4) gemeinsam als singuläre Punktlichtquelle in das Mikroskop (7) eingekoppelt werden.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß vor der Einkopplung in das Mikroskop (7) in einem gekapselten Bauteil eine Strahlvereinigung stattfindet und daß von dort aus über eine vorzugsweise als Single-Mode-Faser ausgeführte Lichtleitfaser (6) in das Mikroskop (7) eingekoppelt wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß einer der Laser (4) unmittelbar und mindestens ein weiterer Laser (1 und/oder 2 und/oder 3) über eine Lichtleitfaser (8) in das gekapselte Bauteil einkoppelt.

15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß vor der Einkopplung in das Mikroskop (7) eine Auswahl und individuelle Einstellung der Linienleistung mittels eines AOTF (Acousto Optical Tunable Filter) (11) erfolgt.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß vor der Einkopplung in das Mikroskop (7) eine Strahlmodulation und ggf. schnelle Strahlabschaltung mittels eines AOM (Acousto Optical Modulator) (13) möglich ist.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

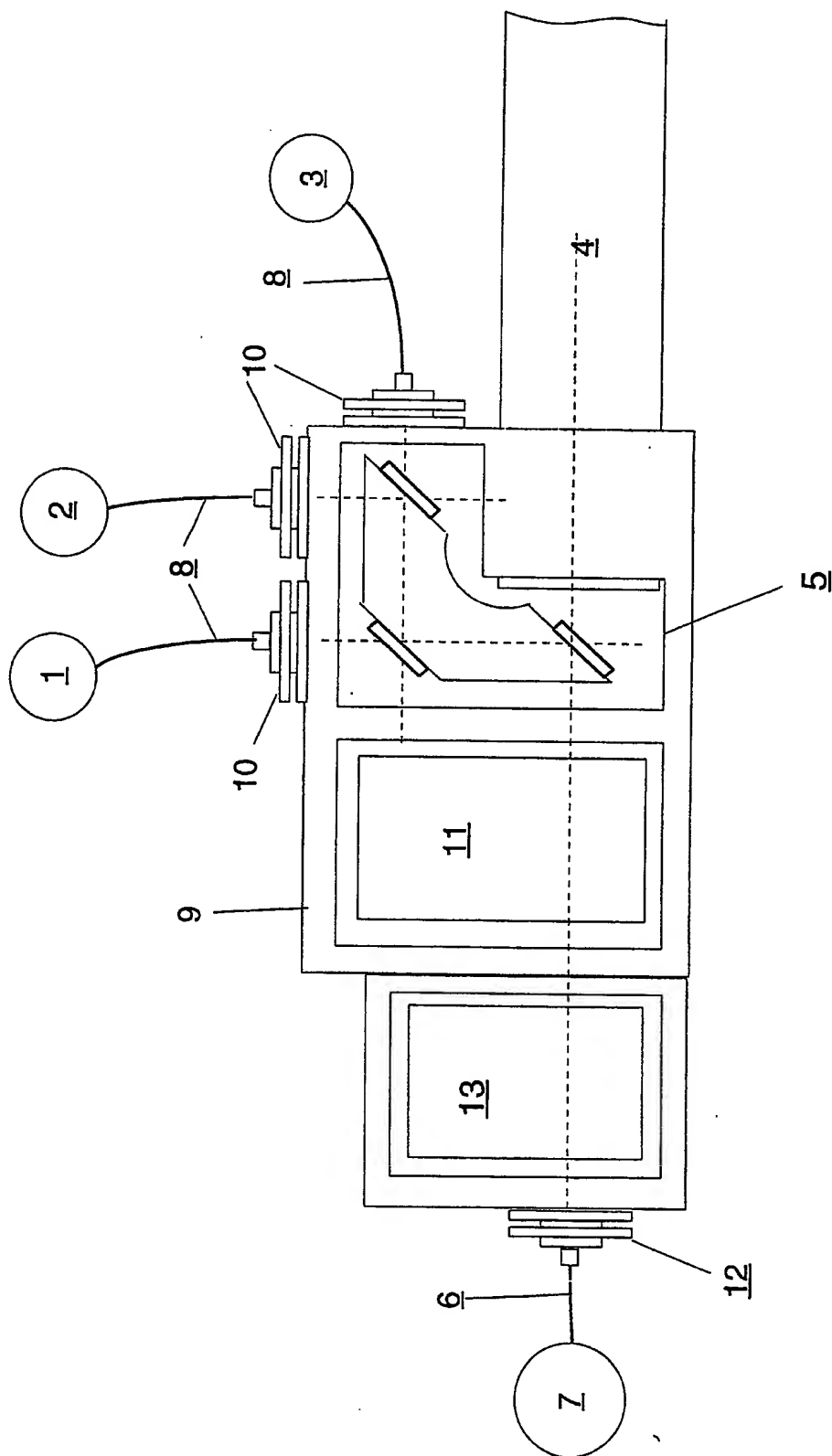


Fig.